

## 3T6 세포주 및 연골 초대배양세포의 Collagen 합성에 미치는 비타민 C의 영향

김 미 향

신라대학교 식품영양학과 및 해양식의약품소재융합기술연구소

### Effect of L-Ascorbic Acid on Collagen Synthesis in 3T6 Fibroblasts and Primary Cultured Cells of Chondrocytes

Mihyang Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Silla University, and Fusion Technology Research  
Institute for Marine Pharmaceutical Materials, Busan 617-736, Korea

#### Abstract

L-Ascorbic acid (AsA) is an essential nutrient for prevention of scurvy in humans, primates and guinea pigs that lack L-gulonolactone oxidase which is required for the final step of AsA biosynthesis. AsA participates in various hydroxylation reactions involved in the biosynthesis of collagen. The purpose of this study is to clarify the role of AsA on collagen synthesis in 3T6 fibroblasts and primary cultured cells of chondrocytes. Cells were cultured in medium supplemented with catalase and AsA at various concentration. Supplement of AsA induced collagen synthesis in 3T6 fibroblasts and primary cultured cells of chondrocytes. The most remarkable induction of collagen synthesis by AsA was found in primary cultured chondrocytes. The content of collagen representing the amounts of extracellular matrix significantly increased in the cells of which growth was stimulated by AsA, while it decreased with increasing passage numbers of subculture in cells. It showed that the content of collagen decreased in the medium which contained AsA at the concentration higher than 5.0 mM. However, the contents of collagen to DNA were not different among various AsA concentrations. Supplementing with AsA resulted in enhancement of collagen formation and extracellular matrix. Therefore, there might be a positive correlation between the activity of catalase and the AsA concentration. Moreover, it can be assumed that AsA stimulates the collagen synthesis by optimizing the cell-culture environment.

**Key words:** ascorbic acid, chondrocytes, collagen, extracellular matrix

#### 서 론

비타민 C(L-ascorbic acid; AsA)는 항 괴혈병 인자로 알려져 있으나, 선진국사회에서는 식생활에 있어서 더 이상 괴혈병은 거의 볼 수가 없고 지금은 생명 유지를 위한 미량 영양소로서의 역할보다도 질병예방, 건강의 유지 및 증진을 위한 역할이 주목되고 있고, 다량섭취도 권장되고 있는 실정이다. 세포 외 결합조직의 주요성분인 콜라겐의 생합성에서 비타민 C는 protocollagen의 proline 및 lysine 잔기의 수산화에 관여하므로 콜라겐의 생합성에 필수 인자이며(1-4), 배양세포를 사용한 실험에서는 비타민 C 첨가에 의해 세포가 여러 층을 형성하나 비타민 C 무 첨가에서는 1~2층만을 형성하는 것으로 알려져 있다(5). 세포외 결합조직의 주성분으로는 콜라겐이나 elastin 외에도 접착성 단백질인 fibronectin, laminin, proteoglycan을 들 수 있으며, 세포외 결합조직은 이러한 거대분자가 상호 결합하여 고도로 조직화되

어진 것이라 할 수 있다. 노화에 따르는 세포외 결합조직의 변화는 일반적으로 기계적 단단함의 증대, 유연성, 탄력성, 팽윤성의 감소 및 효소나 화학약품에 대한 저항성의 증대 등을 나타내고 있다. 또한 노화와 더불어 세포외 결합조직의 양적 변화도 나타난다. 심장, 신장, 간장 등은 노화와 더불어 딱딱해지나 이것은 실질세포가 감소하여 콜라겐이 차지하는 비율이 상승하는 것이 그 원인이라고 알려져 있다(6). 세포외 결합조직은 여러 종류의 성분이 상호 관여하면서 구축되어 기능을 발휘하므로 비타민 C의 첨가는 콜라겐 합성의 촉진뿐만 아니라 다른 결합조직 성분에 영향을 줄 가능성도 있다.

비타민 C는 배양세포의 증식을 촉진하는 효과를 나타낸다고 알려져 있으나(7-9), 그 mechanism에 관해서는 확실하지 않다. 세포 증식이나 분화, 유주, 조직화 등의 세포기능은 세포외 결합조직에 영향을 받으나, 비타민 C는 그 주성분인 콜라겐 합성에 필수인자이므로 간접적으로 세포증식에 효과를 가지는 것으로 추측할 수 있다. 그러나 고농도의 비

타민 C, 세포밀도가 높을수록, 계대횟수 많을수록 세포증식이 억제되는 것으로 알려져 있다(10-13). 한편, 연골은 조직 내에 혈관이 분포되어 있지 않으므로 생체에서 연골세포만을 분리하기 쉽고 초대배양이 가능하다. 연골세포는 연골형 proteoglycan 및 콜라겐 생합성 등 분화기능발현 뿐만 아니라 DNA 합성, 세포증식, 성장인자 및 호르몬 등의 작용을 연구하기 위한 재료로 적합하고 세포의 결합조직의 주성분인 콜라겐 합성에는 비타민 C가 필수이므로 연골세포는 비타민 C와 세포증식과의 관계를 연구하는데 적합한 것으로 예상된다(14-20). 따라서 본 연구에서는 비타민 C의 배양세포 증식을 촉진하는 기능을 세포 간 결합조직의 주성분인 콜라겐 생합성에 초점을 맞추어, 세포로는 계대배양이 가능하며 콜라겐 합성능을 가지는 세포주인 3T6섬유아세포(21)와 초대배양세포로서 콜라겐 합성이 가능한 흰쥐 연골세포를 이용하였다. 또한 콜라겐 생합성에 미치는 비타민 C의 영향을 검토하기 위하여 세포 및 세포 외액 중의 콜라겐 함량의 분석과 콜라겐 생합성에 미치는 비타민 C의 영향을 각 농도별로 분석하여 콜라겐 생합성에 필요한 비타민 C의 적합한 첨가 농도를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 배지의 조제

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(日水製藥, Japan)은 용해한 후 120°C에서 15분간 멸균하였고, 2.92 g/100 mL L-glutamic acid(和光純藥工業, Japan) 10 mL와 7% sodium carbohydrate(大冢製藥, Japan) 10 mL를 첨가하였다. Fetal Bovine Serum(FBS, GIBCO LABORATORIES)은 56°C에서 30분간 가열처리에 의해 불활성화시켜 사용하기 전까지 -20°C에서 동결 보존하였다.

### 연골세포의 분리

3주령의 Sprague-Dawley계(60~70 g 전후) 흰쥐에 마취약(sodium pentobarbital, 일본제약)을 복강 내 투여하여 마취하고 염화 benzalcornium액으로 소독하였다. 흉부로부터 늑골을 적출한 후 늑 연골을 하나씩 분리하고 주위의 연조직을 제거한 후 성장연골만을 잘게 잘랐다. 0.1% EDTA-2Na 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 보온한 후 phosphate-buffered saline으로 3번 세정한 후 0.2% collagenase 용액으로 37°C에서 2~3시간 각반하고 세포를 분산시켰다. 세포현탁액을 여과하고 여액을 1,500 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 원심분리 조작을 3번 행하고 다시 현탁액을 500 rpm으로 수 초간 원심 분리하여 조직단편 등의 침전을 제거하여 연골세포를 얻었다.

### 세포배양 조건

본 실험에 사용한 3T6 mouse 섬유아세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하였고, 흰

쥐에서 분리한 초대연골세포를  $\phi 60$  mm dish에  $5 \times 10^4$  cells/dish 되도록 접종하였다. 배지는 FBS를 5% 첨가한 DMEM(DMEM-5)를 사용하였고, sodium ascorbic acid(AsA-Na)는 0.5 mM 농도로, catalase는 750 U/mL 활성이 되도록 조제하였다. 콜라겐 합성에 미치는 세포종의 차이를 알아내기 위하여 3T6 섬유아세포는 배양 후 2, 4, 6, 8일째의 세포를 시료로 하였고, 흰쥐에서 분리한 연골세포는 AsA-Na 및 catalase를 첨가하지 않고 DMEM-5만으로 4일간 배양한 후 AsA-Na 첨가를 개시하였다. AsA 첨가 개시 후 1, 3, 7, 11, 21일 째의 세포를 시료로 하였다. 또한 콜라겐 합성에 미치는 비타민 C의 영향을 검토하고자 1회 계대 배양한 연골세포에 각 농도의 AsA-Na를 첨가하여 실험하였다. AsA-Na는 0, 0.1, 1, 2, 5, 7 및 10 mM 농도로 첨가하였고, 배양 2, 4, 7, 9, 12, 15, 21일째의 세포를 시료로 하였다.

### 세포 중의 DNA 양 측정

**시약:** A액 - 0.1 M NaCl과 5 mM EDTA를 포함하는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)

B액 - 1 mg/mL DAPI 용액(Sigma Co.)

C액 - 10 U/mL pronase(Type I Crude, Sigma Co.)

D액 - 1 g/mL 송아지 흉선 DNA 용액(Sigma Co.)

**방법:** PBS(-)로 세정 후 C액을 A액으로 200배 희석한 용액을 가하여 37°C에서 1시간 가온한 후 세포를 파쇄하여 B액을 A액으로 10,000배로 희석하여 첨가하고 잘 혼합하여 여기파장 350 nm, 형광파장 452 nm에서 형광광도를 측정하였다. 검량선은 D액을 A액으로 희석하여 표준 송아지흉선 DNA가 40, 20, 10, 5  $\mu$ g/mL 되도록 하여 작성하였다.

### 시료조제방법

배양액과 세포층을 나누어 배양액을 가수 분해관에 넣고, 세포층은 PBS(-)로 2~3회 세정한 후 모은 다음, dish를 0.05 M tris-buffer(pH 7.2~7.4) 1 mL로 3회 세척하고 세포 현탁액을 가수 분해관에 넣어 110°C에서 24시간 가수분해하였다. 냉각 후 여과해서 hydroxyproline 측정용 시료로 하였다.

### 콜라겐 측정방법

Hydroxyproline의 측정은 Woessner법(21)을 이용하였고, 얻어진 hydroxyproline량으로부터 콜라겐량을 환산하였다. 시료용액 2 mL에 chloramine T 용액 1 mL 첨가하여 혼합하고 20분간 방치 후 과염소산용액 1 mL 가하여 혼합한 다음 60°C에서 20분간 가온하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐 중에 hydroxyproline이 약 10% 포함되어 있으므로, hydroxyproline(mg/100 mL)  $\times 100/11$  = 콜라겐으로 산출하였다.

### 통계처리

실험의 분석결과는 각각의 처리별로 평균치와 표준편차(mean  $\pm$  SD)를 사용하여 표기하였으며, 유의성 검정에는 Student's *t*-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

콜라겐은 세포 간 결합조직의 주성분이며, 세포 간 결합조직은 세포접착, 증식, 분화 및 분화된 세포의 기능과 형태유지를 위해 중요한 역할을 하고 있으므로 중요한 생체성분으로 주목받고 있다. 본 실험에서는 비타민 C의 세포증식촉진 효과를 밝히려는 수단으로 세포 간 결합조직에 착목하여 콜라겐 합성량에 대하여 조사하였다.

배양일수에 따른 콜라겐 합성에 대한 비타민 C의 영향

3T6 섬유아세포 및 초대연골 세포의 배양일수를 x축으로 세포층에 형성한 콜라겐 양을 y축으로 하여 1차식에 적용하였을 때 비타민 C를 첨가하지 않은 연골세포를 제외하고 모두  $r=0.95$  이상의 상관계수가 나타나 콜라겐 양은 배양일수에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 1차식의 기울기를 1일당 콜라겐 합성량으로 보았을 때 3T6 섬유아세포의 비타민 C 첨가군의 콜라겐 생성량(0.171)은 무첨가 경우(0.034)의 약 5배였다. 또한 연골세포의 콜라겐 생성량(0.807)은 3T6 섬유아세포(0.171)의 약 5배로 연골세포에서의 콜라겐 합성속도는 3T6 섬유아세포보다 빠른 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과로부터 비타민 첨가에 의해 세포의 콜라겐 합성량은 증가하는 것으로 밝혀졌고, 3T6 섬유아세포와 초대연골세포를 비교하면 생성되는 콜라겐 양에서도 차이가 나는 것을 알 수 있었다.

비타민 C를 1.0 mM 농도가 되도록 첨가하여 3T6 섬유아세포 및 초대연골 세포를 배양하였을 때 두 세포 모두에서 콜라겐 양은 비타민 C를 첨가한 세포가 높은 수치를 나타내어 비타민 C에 의한 콜라겐 합성의 촉진효과가 현저하였으며 일수의 증가에 따라 그 합성량도 증가하였다(Fig. 1, 2). 또한 3T6 섬유아세포는 배양 6~8일에 접촉 증식제어 현상이 일어나 8일째 이후 세포가 plate에서 박리되었으나, 연골세포는 증식을 계속하는 것으로 나타났다. 비타민 C 무첨가의 경우 세포층의 콜라겐 합성량을 3T6 섬유아세포와 연골세포를 비교하였을 때 3T6 섬유아세포의 경우 배양일수의 경과와 더불어 콜라겐 양이 증가하여 8일째에는 2일째의 약 5.5배였으나 연골세포의 경우 1일째부터 21일째까지 콜라겐 양은 거의 변화하지 않았다. 배지 중의 콜라겐 양을 비교하여도 3T6 섬유아세포의 경우는 배양 8일째에 2일째의 약 3배가 되었으나 연골세포에서는 21일간 거의 양의 변화가 없어 세포층의 결과와 일치하였다(Fig. 3, 4). 본 실험에 사용한 DMEM 배지에는 비타민 C가 함유되어 있지 않으며, 혈청

Table 1. Regression equation of collagen synthesis in cells

	3T6 fibroblast	Chondrocyte
Control	$y=0.034x-0.02$ ( $r=0.998$ )	-
AsA	$y=0.171x-0.41$ ( $r=0.951$ )	$y=0.807x-1.24$ ( $r=0.988$ )

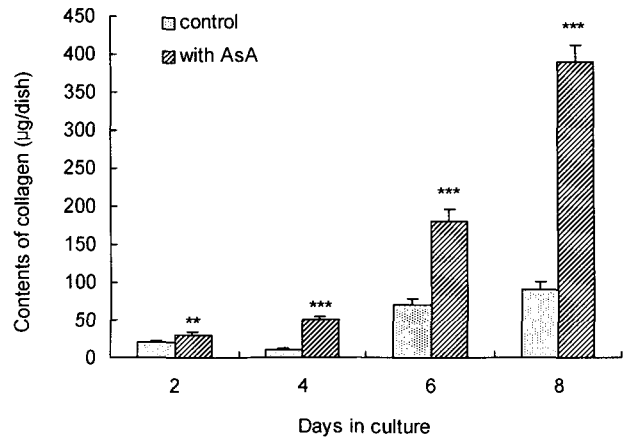


Fig. 1. Effect of AsA on collagen synthesis in 3T6 fibroblasts.

The cells were cultured in DMEM-5 in the absence (control) or presence (with AsA) of 1 mM AsA. Significantly different from the value of control group at \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

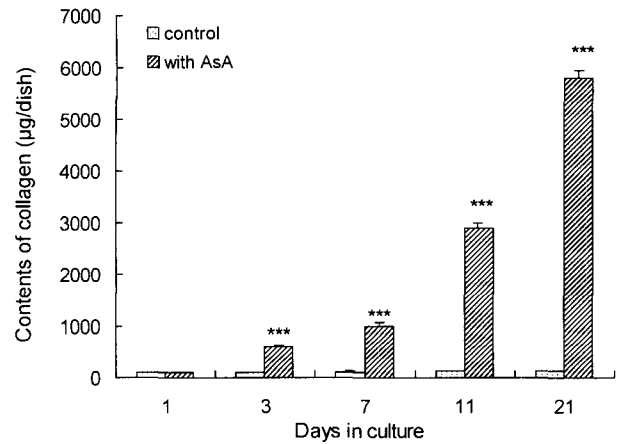


Fig. 2. Effect of AsA on collagen synthesis in chondrocytes.

The cells were cultured in DMEM-5 in the absence (control) or presence (with AsA) of 1 mM AsA. Significantly different from the value of control group at \*\*\* $p<0.001$ .

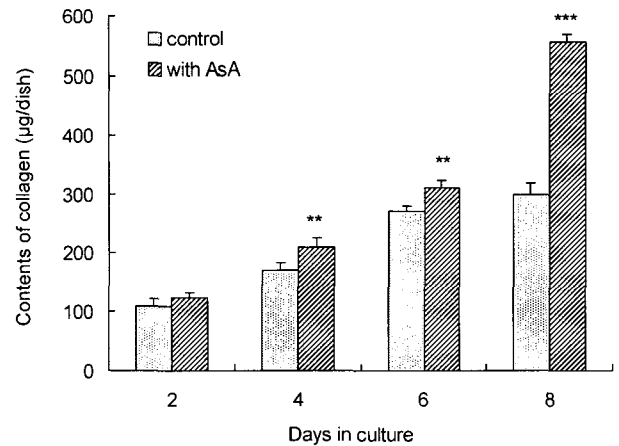
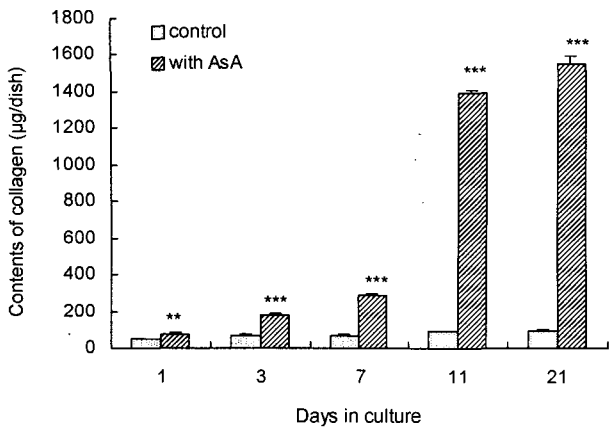


Fig. 3. Effect of AsA on collagen in 3T6 fibroblasts cultured medium.

Significantly different from the value of control group at \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

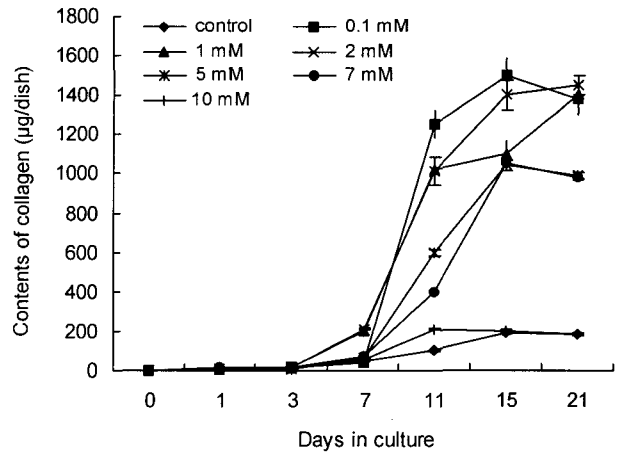


**Fig. 4. Effect of AsA on collagen in chondrocytes cultured medium.**  
Significantly different from the value of control group at \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

중의 비타민 C 함량을 측정하기 위하여 HPLC를 사용하여 분석하였으나 검출되지 않았다. 비타민 C를 첨가하지 않았음에도 불구하고 3T6섬유아세포에서 콜라겐 합성이 이루어졌다는 것은 3T6세포의 비타민 C에 대한 감수성이 매우 높은 까닭에 혈청 중에 비타민 C가 검출되지 않을 정도의 미량으로 존재하여도 콜라겐 합성이 이루어진 것으로 추측된다. 본 실험에 사용한 연골세포는 초대배양세포로서 세포로부터 비타민 C의 공급이 되지 않을 경우 콜라겐 합성은 일어나지 않는 것으로 사료된다. 따라서 배양세포의 콜라겐 합성에 미치는 비타민 C의 영향을 검토하기 위하여 초대연골세포를 이용하여 비타민 C의 농도를 변화시켜 가면서 콜라겐 합성량을 측정하였다.

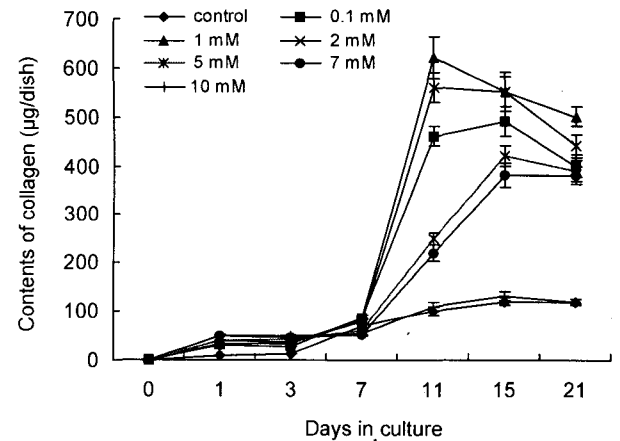
**비타민 C의 첨가농도에 따른 콜라겐 합성 변화**

비타민 C의 생리기능은 환원제로서의 역할에 의한 것으로 추측되며, 특히 콜라겐의 proline 및 lysine의 수산화에 관한 연구가 대부분이다(1-4). 콜라겐은 세포 간 결합조직의 주성분으로 세포 간 결합조직이 세포의 분화 및 세포증식 제어에 영향을 주는 것으로 알려져 주목되고 있다. 비타민 C가 콜라겐 합성에 필수 성분으로 알려져 있음에도 불구하고 고농도의 비타민 C가 세포에 미치는 작용에 관한 연구는 많지 않다. 고농도의 비타민 C는 세포독성을 발현하므로 콜라겐을 연구하는 경우 세포실험에 적합하지 않기 때문이다. 그러나 전보(22)에서 비타민 C의 세포독성은 catalase를 사용하는 것에 의해 제거될 수 있음을 확인하였으므로 생체 내를 반영한 환경에서 배양하기 위해 catalase를 첨가하여 세포독성을 억제해야 할 것으로 사료되어, 본 실험에서는 catalase를 첨가하여 세포독성을 억제한 경우 콜라겐 합성에 미치는 비타민 C의 영향을 검토하였다. 그 결과 배양 7일째 이후에는 비타민 C의 농도와 관계없이 무 첨가보다 높은 콜라겐 합성량을 나타냈다(Fig. 5, 6). 그러나 5, 7, 10 mM의 비타민 C를 첨가한 경우 세포내와 배지 내의 결과가 모두



**Fig. 5. Effect of AsA concentration on collagen synthesis in chondrocytes.**

The cells were cultured in DMEM-5 in the absence (control) or presence of ascorbate (0.1~10 mM).



**Fig. 6. Effect of AsA concentration on collagen secreted in chondrocytes cultured medium.**

0.1, 1, 2 mM을 첨가한 경우보다 낮은 수치를 나타내었다. 한편 DNA양에 대한 세포층의 콜라겐 양으로 환산하였을 때 1.0~7 mM의 비타민 C 첨가농도에 의한 차이가 나타나지 않았고 10 mM의 비타민 C 첨가 시에도 배양 11일째까지 다른 첨가 농도와 비슷한 경향을 나타내어, 어느 쪽도 비타민 C 무 첨가 경우의 콜라겐 합량보다 높았다(Fig. 7).

Hata는 비타민 C 농도가 0.5 mM 이상의 경우 콜라겐 합성을 억제한다고 하였다(23). 그러나 catalase를 사용하여 생체 에 가까운 환경으로 한 본 실험에서 콜라겐 합성 증가 효과는 저 농도의 비타민 C 첨가군과 차이를 보이지 않았다. 이러한 이유로부터 생체 내에서는 고 농도 비타민 C에 의한 콜라겐 합성의 억제는 일어나지 않는 것으로 추측되며 비타민 C를 사용하는 배양세포의 실험체에 대한 검토의 필요성이 시사되었다. 5 mM, 7 mM, 10 mM의 비타민 C를 첨가한 경우 저 농도의 비타민 C 첨가 경우보다 plate 내의 총 콜라겐 합량은 적었다. 그러나 DNA양에 대한 콜라겐 합량을 비

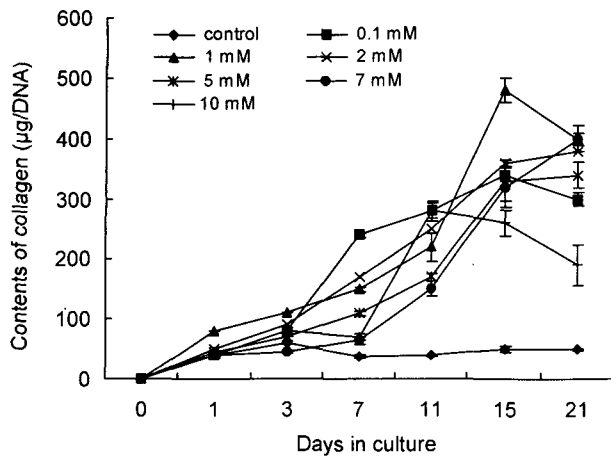


Fig. 7. Effect of AsA concentration on collagen synthesis to DNA concentration in chondrocytes.

The cells were cultured in DMEM-5 in the absence (control) or presence of ascorbate (0.1~10 mM).

교하였을 때 5 mM 이상의 비타민 C 첨가에서는 콜라겐 합성 증가량이 조금 낮은 경향을 보였으나, 0.1~2 mM을 첨가하였을 때의 콜라겐 양과 최종적으로는 거의 비슷한 수치를 나타내었다. 따라서 catalase를 첨가한 배지를 사용할 경우 세포내의 콜라겐 합성량에 대한 비타민 C 첨가 농도에 따른 차이는 크게 없는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 비타민 C의 배양세포 증식을 촉진하는 기능을 세포 간 결합조직의 주성분인 콜라겐 생합성에 초점을 맞추어 3T6 세포주 및 흰쥐에서 분리한 초대 연골세포를 이용하여, 세포 및 세포 외액 중의 콜라겐 함량의 분석과 콜라겐 생합성에 미치는 비타민 C의 영향을 각 농도별로 분석하여 콜라겐 생합성에 필요한 비타민 C의 적합한 첨가 농도를 검토하였다. 비타민 C를 1.0 mM 농도가 되도록 첨가하여 3T6 섬유아세포 및 초대연골 세포를 배양하였을 때 양 세포 모두 콜라겐 양은 비타민 C를 첨가한 세포가 높은 수치를 나타내어 비타민 C에 의한 콜라겐 합성의 촉진효과가 현저하였으며 일수의 증가에 따라 그 합성량도 증가하였다. 비타민 C 무첨가의 경우 세포층의 콜라겐 합성량을 3T6 섬유아세포와 연골세포를 비교하였을 때 3T6 섬유아세포의 경우 배양일수의 경과와 더불어 콜라겐 양이 증가하였으나 연골세포의 경우 1일째부터 21일째까지 콜라겐양은 거의 변화하지 않아, 본 실험에 사용한 연골세포는 초대배양세포로서 세포외로부터 비타민 C의 공급이 되지 않을 경우 콜라겐 합성은 일어나지 않는 것으로 사료된다. 따라서 배양세포의 콜라겐 합성에 미치는 비타민 C의 영향을 검토하기 위하여 초대연골세포를 이용하여 비타민 C의 농도를 변화시켜 가면서 콜라겐 합성량을 측정하였다. 5 mM, 7 mM, 10 mM의 고농도의 비타민 C를 첨가한 경우 저 농도의 비타민 C 첨가

경우보다 plate 내의 총 콜라겐 함량은 적었다. 그러나 DNA 양에 대한 콜라겐 함량을 비교하였을 때 5 mM 이상의 비타민 C 첨가에서는 콜라겐 합성 증가량이 조금 낮은 경향을 보였으나, 0.1~2 mM을 첨가하였을 때의 콜라겐 양과 최종적으로는 거의 비슷한 수치를 나타내었다. 0.5 mM 이상의 비타민 C 첨가는 콜라겐 합성을 저해한다는 기존의 보고와는 달리 본 연구에서는 세포독성을 억제할 목적으로 배지 중에 catalase 첨가하였으며, 그 결과 0.1~10 mM의 비타민 C 농도범위에서는 콜라겐 합성량에 차이가 크게 없는 것으로 나타나, 0.1~10 mM의 비타민 C 농도로는 catalase를 첨가한 배지를 사용할 경우 세포내의 콜라겐 양에 대한 비타민 C 첨가농도별 차이는 크게 없는 것으로 추측된다.

## 문 헌

- Peterkofsky B. 1972. The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblast. *Arch Biochem Biophys* 152: 318-328.
- Murad S, Sivarajah A, Pinnel SR. 1981. Regulation of prolyl and lysyl hydroxylase activities in cultured human skin fibroblasts by ascorbic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 101: 868-875.
- Yu R, Kurata T, Kim M, Arakawa N. 1991. The behavior of L-ascorbic acid in the healing process of dorsal wounds in guinea pigs. *J Nutr Sci Vitaminol* 37: 207-211.
- Kim M, Otsuka M, Yu R, Kurata T, Arakawa N. 1994. The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Internat J Vit Nutr Res* 64: 56-59.
- 藤本大三郎 1990. 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. アイピーシー, 東京. p 32.
- Robins SP, Baily AJ. 1997. The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem J* 163: 339-346.
- Murad S, Tajima S, Johnson GR, Sivarajah A, Pinnel SR. 1981. Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic and its analogs. *J Invest Dermatol* 81: 158-162.
- Peterkofsky B. 1972. The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 152: 318-328.
- Murata A. 1990. Diverse functions and functional mechanism of vitamin C. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 64: 1843-1845.
- Samuni A, Aronovitch J, Godinger D, Chevion M, Czapski G. 1983. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific fenton mechanism. *Eur J Biochem* 137: 119-125.
- Kageyama K, Yamada R, Otani S, Hasuma T, Yoshimata T, Seto C, Takeda Y, Yamaguchi Y, Kogawa H, Miwa N. 1999. Abnormal cell morphology and cytotoxic effect are induced by 6-o-palmitol-ascorbate-2-0-phosphate but not by ascorbic acid or hyperthermia alone. *Anticancer Res* 19: 4321-4326.
- Jampel HD. 1990. Ascorbic acid is cytotoxic to dividing human tenon's capsule fibroblasts: a possible contributing factor in glaucoma filtration surgery success. *Arch Ophthalmol* 108: 1323-1329.
- Yue BYJT, Niedra R, Baum JL. 1989. Human corneal endo-

- thellal cell culture. *Invertig Ophthalmol Vit Sci* 30: 248-254.
14. 野田政樹. 1998. 骨のバイオロジー. 羊土社, 東京. p 56.
  15. Benton HP, Tyler JA. 1998. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 421-428.
  16. Berg RA, Steinmann B, Rennard SI, Crystal RG. 1983. Ascorbate deficiency results in decreased collagen production: Under hydroxylation of proline leads to increased intracellular degradation. *Arch Biochem Biophys* 262: 681-686.
  17. Pacifici M. 1990. Independent secretion of proteoglycans and collagens in chick chondrocyte cultures during acute ascorbic acid treatment. *Biochem J* 172: 193-199.
  18. Yu R, Kurata T, Kim M, Arakawa N. 1991. The behavior of L-ascorbic acid in the healing process of dorsal wounds in guinea pigs. *J Nutr Sci Vitaminol* 37: 207-211.
  19. Kim M, Otsuka M, Yu R, Kurata T, Arakawa N. 1992. The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Internat J Vit Nutr Res* 64: 56-59.
  20. Kim M, Otsuka M, Shimamura E, Arakawa N. 1998. The effect of L-ascorbic acid on age-related changes of pyridinoline in cartilage collagen of guinea pigs. *J Nutr Sci Vitaminol* 44: 217-224.
  21. Woessner JF. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447.
  22. Kim M. 2004. The effect of high concentration of ascorbic acid on the growth of primary cultured cells of chondrocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 797-802.
  23. Hata R. 1998. Regulation of collagen gene expression by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 72: 1191-1194.

(2005년 10월 25일 접수; 2005년 12월 23일 채택)